

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ESTRUTURAL, MOLECULAR E GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

CAMILA AUDREY DOS REIS

**EXPRESSÃO E ATIVIDADE DE MMP-2 E MMP-9 DURANTE O
DESENVOLVIMENTO DO INTESTINO DELGADO DE RATOS**

PONTA GROSSA

2019

CAMILA AUDREY DOS REIS

**EXPRESSÃO E ATIVIDADE DE MMP-2 E MMP-9 DURANTE O
DESENVOLVIMENTO DO INTESTINO DELGADO DE RATOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. José Rosa Gomes

PONTA GROSSA

2019

R374 Reis, Camila Audrey dos
Expressão e atividade de MMP-2 e MMP-9 durante o desenvolvimento
do intestino delgado de ratos. / Camila Audrey dos Reis . Ponta Grossa,
2019.
40 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas - Área de
Concentração: Biologia Celular e Molecular), Universidade Estadual de
Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. José Rosa Gomes.

1. Desenvolvimento. 2. Imuno-histoquímica. 3. Intestino delgado de
rato. 4. Metaloproteinase. 5. Zimografia. I. Gomes, José Rosa. II.
Universidade Estadual de Ponta Grossa. Biologia Celular e Molecular. III.T.

CDD: 574



Universidade Estadual
de Ponta Grossa

Programa de
Pós Graduação
em Ciências Biomédicas



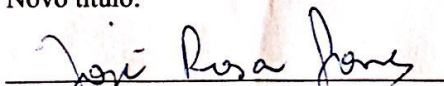
ATA DE DEFESA DE QUALIFICAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NÍVEL DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR, NÚMERO DA ATA 01/2019, DA MESTRANDA CAMILA AUDREY DOS REIS NO DIA 21 DE FEVEREIRO DE 2019, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos **21 DIAS DO MÊS DE FEVEREIRO DE 2019**, às 9h na sala 107 do bloco M da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em seção pública sob a presidência do Prof Dr Jose Rosa Gomes reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas da mestranda CAMILA AUDREY DOS REIS na linha de pesquisa: BIOLOGIA CELULAR E DO DESENVOLVIMENTO, constituída pelos membros titulares: Profa Dra Luzmarina Hernandez (UEM) como membro externo ao programa e Profa Dra Michele Dietrich Moura Costa (UEPG) como membro do programa, para avaliação da etapa de defesa da dissertação. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e à candidata das normas que regem a defesa da dissertação de Mestrado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título da dissertação avaliada foi: **EXPRESSÃO E ATIVIDADE DE MMP-2 E MMP-9 DURANTE O DESENVOLVIMENTO DO INTESTINO DELGADO DE RATOS**. Encerrado os procedimentos de análise, a banca comunicou o resultado final da avaliação da dissertação como APROVADA, considerado requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas. O aluno deverá entregar, no prazo estipulado no item 8 da IN 01/2015, referente a defesa de dissertação do programa com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Para a obtenção do título de mestre, o aluno terá até 6 meses, após a data da defesa da sua dissertação, para apresentar ao colegiado a carta de submissão do seu artigo em revista indexada no estrato mínimo B3 dentre os periódicos indicados pela área de Ciências Biológicas II vigente. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

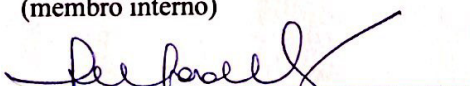
Observações (se necessário):

Alteração de título: sim ☐ não ☒

Novo título:


Prof Dr Jose Rosa Gomes (presidente)


Dra Michele Dietrich Moura Costa
(membro interno)


Profa Dra Luzmarina Hernandez (UEM)
(membro externo)

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a Deus, por estar comigo em todos os momentos e não permitir que eu desistisse, mesmo quando pensei ser a única saída.

À minha família, por todo o apoio e compreensão, e por me ensinarem a ter determinação em tudo o que propuser-me a fazer.

Aos meus amigos, que deixaram os fardos mais leves de carregar. Em especial agradeço ao Cleyson, que compartilhou os melhores mas também os mais difíceis momentos nessa trajetória.

Às professoras Cristina, Albertina e Nádia, por todo o apoio e carinho demonstrados para comigo durante todo o tempo que permaneci no laboratório, desde minha iniciação científica júnior.

Aos meus colegas de laboratório e de mestrado, que em muitos momentos auxiliaram nos experimentos.

Aos alunos, técnicos e professores de outros laboratórios por disponibilizarem equipamentos ou recursos essenciais para essa pesquisa.

À UEPG e CAPES, por fornecerem estrutura e suporte financeiro para o desenvolvimento da pesquisa.

A todos àqueles que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse possível.

E principalmente agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. José Rosa Gomes, por toda a paciência, dedicação e apoio, não só na pesquisa como também fora da universidade. Muito obrigada!

RESUMO

REIS, Camila Audrey dos. **Expressão e atividade de MMP-2 e MMP-9 durante o desenvolvimento do intestino delgado de ratos**. 2019. 40 páginas. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2019.

As metaloproteinases de matriz (MMPs) 2 e 9 são enzimas bem estudadas quanto aos seus papéis no remodelamento dos tecidos, seja em condições patológicas ou durante o processo de morfogênese. No entanto, quanto ao desenvolvimento do intestino delgado (ID) e seu crescimento que inicia na vida intrauterina e continua após o nascimento, ainda há poucos relatos sobre o papel dessas MMPs. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar a expressão e atividade da MMP-2 e MMP-9 durante o desenvolvimento intrauterino e pós-natal do intestino delgado do rato. Os intestinos foram coletados de ratos no 15º e 18º dia de vida intrauterina (IU) e no 3º, 10º, 17º, 25º e 32º dia após o nascimento. As amostras foram submetidas aos métodos de zimografia, imuno-histoquímica e histoquímica. Os resultados mostraram que não houve atividade e expressão de MMP-2 e MMP-9 no intestino delgado durante as fases de vida intrauterina avaliadas. Na vida pós-natal não houve expressão e atividade da MMP-2, mas apenas a expressão e atividade da MMP-9 foram detectadas nos tempos avaliados. A MMP-9 foi imunolocalizada nas células caliciformes das vilosidades e em células da lâmina própria. Posteriormente, células identificadas como mastócitos pelo método Tricrômico de Masson foram encontradas em regiões que coincidem com aquelas onde foram encontradas células imuno-coradas. Com isso sugere-se que a MMP-2 e MMP-9 podem não ter função durante o desenvolvimento do intestino delgado nas idades avaliadas no trabalho. No entanto, a MMP-9 foi detectada nas células caliciformes e na lâmina própria após o nascimento, indicando uma possível atividade relacionada à defesa imunológica durante o crescimento pós-natal do intestino delgado.

Palavras-chave: desenvolvimento, imuno-histoquímica, intestino delgado de rato, metaloproteinase, zimografia.

ABSTRACT

REIS, Camila Audrey dos. **Expression and activity of MMP-2 and MMP-9 during development of rat small intestine.** 2019. 40 páginas. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2019.

Matrix metalloproteinases (MMPs) 2 and 9 are well studied enzymes for their roles in tissue remodeling, either under pathological conditions or during the morphogenesis process. However, regarding the development of the small intestine (ID) and its growth that begins in intrauterine life and continues after birth, there are still few reports about the role of these MMPs. Therefore, this study aimed to evaluate the expression and activity of MMP-2 and MMP-9 during intrauterine and postnatal development of rat small intestine. Intestines were collected from rats on the 15th and 18th day of intrauterine life (IU) and on the 3rd, 10th, 17th, 25th and 32nd day after birth. The samples were submitted to zymography, immunohistochemistry and histochemistry methods. The results showed that there was no activity and expression of MMP-2 and MMP-9 in the small intestine during the evaluated intrauterine life stages. In postnatal life there was no expression and activity of MMP-2, but only the expression and activity of MMP-9 were detected at the times evaluated. MMP-9 was immune localized into villi goblet cells and lamina propria cells. Subsequently, cells identified as mast cells by the Masson's Tricomic method were found in regions that coincide with those where immuno-stained cells were found. Thus, it is suggested that MMP-2 and MMP-9 may have no function during the development of the small intestine at the ages evaluated at work. However, MMP-9 was detected in goblet cells and lamina propria after birth, indicating a possible immune defense-related activity during postnatal growth of the small intestine.

Keywords: development, immunohistochemistry, rat small intestine, metalloproteinase, zymography.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. OBJETIVOS.....	9
2.1 OBJETIVO GERAL.....	9
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	10
3.1. INTESTINO DELGADO DE MAMÍFEROS.....	10
3.2. DESENVOLVIMENTO DO INTESTINO DELGADO.....	12
3.3. METALOPROTEINASES.....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1. ANIMAIS.....	19
4.1.1. Coleta das amostras:.....	19
4.2. ZIMOGRÁFIA.....	19
4.2.1. Testes de inibição de proteases:.....	20
4.3. PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS.....	20
4.3.1. Imuno-histoquímica para MMP-9 e MMP-2.....	20
4.3.2. Histoquímica para identificação de células.....	21
5. RESULTADOS.....	22
6. DISCUSSÃO.....	26
7. CONCLUSÃO.....	30
REFERÊNCIAS.....	31

1. INTRODUÇÃO

Dentro do vasto mundo animal, os mamíferos representam uma grande parcela e podem ser encontrados nos mais variados habitats, como os morcegos dotados da capacidade de voar, as baleias e o peixe-boi no meio aquático e uma infinidade de mamíferos que ocupam o meio terrestre, dentre os quais o homem.

Assim, em função da grande diversidade de mamíferos existentes torna-se relevante todos os estudos que tenham enfoque em dois aspectos: a relação do animal com o seu meio ambiente e a relação entre os componentes de seu ambiente interno, representados pelo conjunto de diferentes tipos celulares que compõem o organismo. Estudar a relação dessas células e tecidos em nível celular, molecular e microscópico permite o entendimento das relações do organismo (animal) com o seu meio externo anteriormente mencionado. Dentro desse último aspecto está o estudo dos processos de desenvolvimento de órgãos e sistemas e, embora os mamíferos sigam o mesmo padrão de desenvolvimento inicial na formação do organismo e tenham as funções gerais já bem estabelecidas, ainda existem aspectos não totalmente elucidados que podem diferenciá-los, seja na morfologia, na fisiologia ou no processo de desenvolvimento de cada órgão.

Tendo essas idéias como princípios de investigação e pelo acúmulo de conhecimento já existente no laboratório de biologia celular e do desenvolvimento da UEPG sobre o desenvolvimento do intestino delgado de ratos, neste trabalho nos interessou avaliar a expressão e atividade das MMP-2 e MMP-9 durante algumas fases do desenvolvimento do intestino delgado tanto na vida intrauterina quanto pós-natal. Denominadas de metaloproteinases de matriz (MMPs) essas enzimas são responsáveis pela remodelação dos componentes da matriz extracelular não apenas durante o desenvolvimento mas também em várias condições patológicas sendo isso já amplamente descrito na literatura. Entretanto, na literatura pesquisada e apresentada na revisão dessa dissertação, além do trabalho realizado no laboratório, não existem relatos da avaliação dessas MMPs durante o desenvolvimento do intestino o que tornou essa abordagem nova e interessante.

Neste trabalho foram utilizados dois métodos; um foi a zimografia que se baseia na eletroforese das amostras em gel contendo um substrato para as MMPs

com posterior incubação com tampão de ativação (que força a ativação das MMPs quando presentes no gel), e a imuno-histoquímica que localiza em qual tecido ou célula as MMPs são expressas sem indicar se estão ativas ou não. Além disso, como os resultados da zimografia e principalmente da imuno-histoquímica mostraram marcação em células específicas semelhantes a mastócitos, ainda foi realizada uma coloração tricrômica para confirmar se as células eram realmente mastócitos.

Apesar dos resultados terem sido diferentes daqueles previstos pela hipótese formulada, os achados levantam interessantes discussões sobre a expressão da MMP-9 como componente de células que integram o sistema imunológico. Também apontam para futuras abordagens experimentais considerando a relação entre o sistema imunológico e as fases do desenvolvimento do intestino delgado. Esperamos que a leitura dessa dissertação também possa despertar outras idéias e contribuições para esse campo de investigação dentro da pesquisa básica sobre o desenvolvimento do sistema digestório de mamíferos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo foi verificar a expressão e atividade das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 durante as fases de 15 e 18 dias de vida embrionária, e pós-natal, de 3, 10, 17, 25 e 32 dias na região do jejuno do intestino delgado de ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a expressão de MMP-2 e -9 na região do jejuno por imuno-histoquímica;
- Analisar a atividade enzimática de MMP-2 e -9 por zimografia;
- Relacionar uma possível expressão de MMP-2 e -9 com a morfogênese do jejuno nas fases pré e pós-natal avaliadas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. INTESTINO DELGADO DE MAMÍFEROS

O intestino delgado (ID) é um órgão tubular localizado na cavidade abdominal e que compõem o sistema digestório. É um órgão essencial para a nutrição, absorvendo moléculas como carboidratos, proteínas e lipídios, provenientes da digestão dos alimentos. Esses nutrientes são então distribuídos para todo o corpo por uma rede vascular altamente integrada (CHIN, et al., 2017). Além de participar da nutrição, o ID também tem uma importância imunológica, agindo como uma barreira contra microorganismos potencialmente patogênicos (TURNER, 2009; CLEVERS e BEVINS, 2013; SALZMAN et al, 2003, CHU et al, 2012; GOMES et al, 2010).

O ID tem sua porção proximal ligada ao estômago e continua em direção distal até o intestino grosso. Em humanos, possui cerca de 3 centímetros de diâmetro e 6 metros de comprimento. É formado por 3 segmentos: duodeno, jejuno e íleo (Fig 1), sendo o jejuno a maior porção do ID, com aproximadamente 3 metros de extensão (KARARLI, 1995; WALTON, et al., 2016).

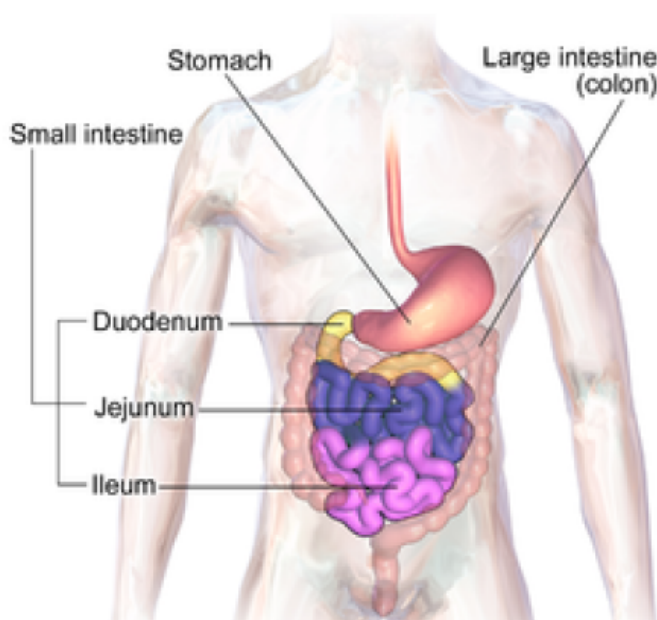


Figura 1 - Esquema representativo da anatomia do intestino delgado. FONTE: https://en.wikipedia.org/wiki/Small_intestine.

Todos os segmentos do intestino delgado possuem camadas histologicamente definidas, denominadas de camada mucosa, submucosa, muscular e serosa (Fig 2). A camada mucosa (camada mais superficial do ID e estudada neste trabalho) é formada por um epitélio cilíndrico simples com diferentes células (Fig 3), entre elas: os enterócitos, responsáveis pela absorção dos nutrientes (compreendem mais de 80% de todas as células epiteliais intestinais); as células caliciformes, produtoras de mucinas; as células de Paneth, sintetizadoras de lisozimas; e por fim,

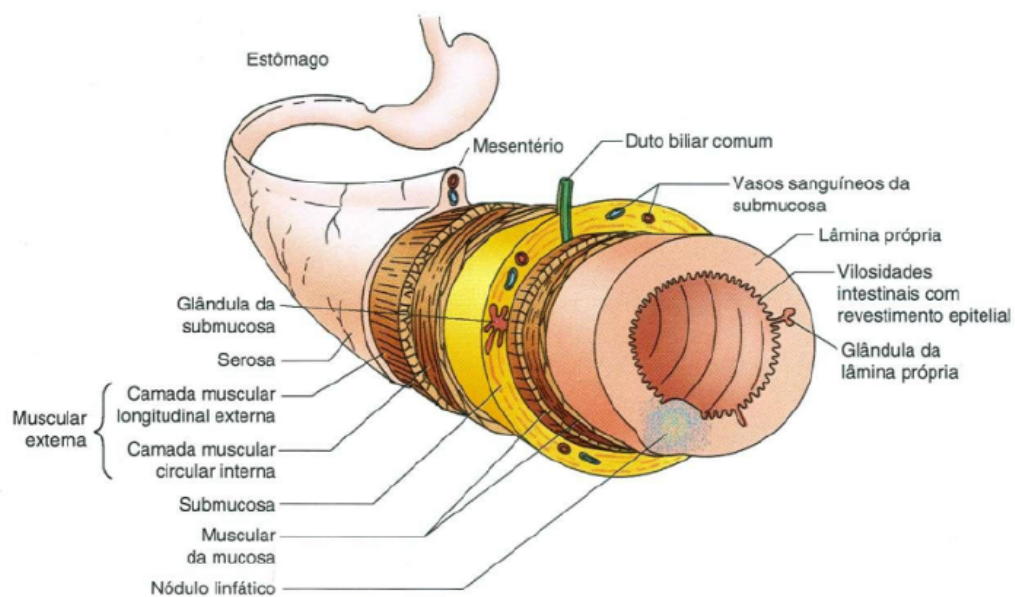


Figura. 2 - Esquema ilustrativo das camadas do intestino. FONTE: GARTNER, L P. e HIATT, J. L., 2007.

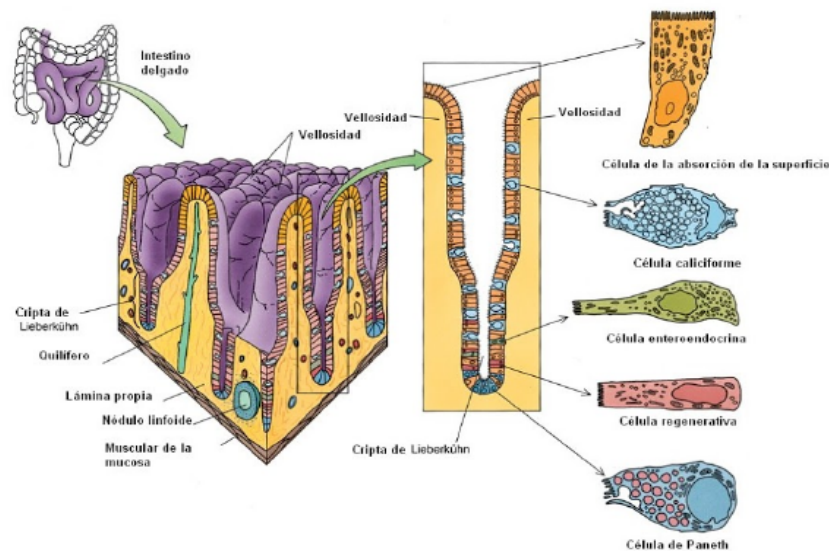


Figura. 3 - Esquema histológico ilustrativo da mucosa intestinal. FONTE: GARTNER, L P. e HIATT, J. L. (2007).

as células enteroendócrinas, secretoras de hormônios gastrointestinais. Também fazem parte da mucosa a lâmina própria, sendo essa uma camada de tecido conjuntivo na qual as células epiteliais se apoiam, e a camada muscular da mucosa, que compreende uma camada fina de músculo liso que separa a mucosa da submucosa (KARARLI, 1995; BARBARA, BRINK e ROBERTS, 2003; NOAH, DONAHUE e SHROYER, 2011). Ao longo do tubo intestinal, a parede do ID é repleta de vilosidades (ou vilos), estruturas digitiformes que se projetam em direção ao lúmen (espaço por onde passa o alimento), formadas por tecido conjuntivo da camada mucosa e revestidas pelo epitélio intestinal. Essas projeções ampliam a área de absorção intestinal de 30m² em cerca de 6,5 vezes num humano adulto (HELANDER e FÄNDRICKS, 2014; WALTON, et al., 2016).

3.2. DESENVOLVIMENTO DO INTESTINO DELGADO

Durante a gastrulação de mamíferos, os folhetos embrionários endoderme, mesoderme e ectoderme estão presentes como uma estrutura plana em forma de disco, formando camadas (SPENCE, LAUF e SHROYER, 2011; ZORN e WELLS, 2009; GUEN et al, 2015; SHAHBAZI, 2016; DEGLINCERTI, 2016). Após o dobramento latero ventral do embrião trilaminar, a endoderme forma um tubo (Fig 4), que dará origem à toda porção epitelial do intestino delgado (SMITH et al., 2000, DAUÇA et. al, 1990). Em ratos, o fechamento do tubo intestinal está completo por volta do 9º dia de vida intra-uterina (SPENCE, LAUF e SHROYER, 2011; LEWIS e TAM, 2006).

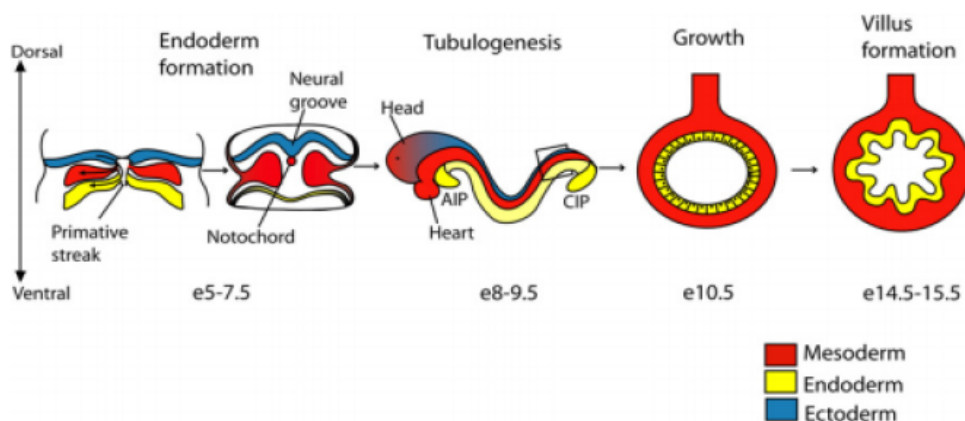


Figura. 4 - Esquema representativo mostrando a formação do tubo intestinal a partir de um folheto embrionário trilaminar. FONTE: NOAH, T. K., DONAHUE, B., & SHROYER, N. F. (2011).

Até aproximadamente o 14º dia de vida intrauterina, o epitélio do intestino delgado sofre uma intensa proliferação (Fig 5), e se torna um epitélio pseudoestratificado, ocluindo lúmen (WALTON et al, 2012; KARLSSON, 2000). A recanalização, ou reabertura do lúmen intestinal ocorre e entre o 15º e 17º dia de vida em ratos pela perda de adesão entre as células epiteliais e apoptose (CHIN, et al., 2017).

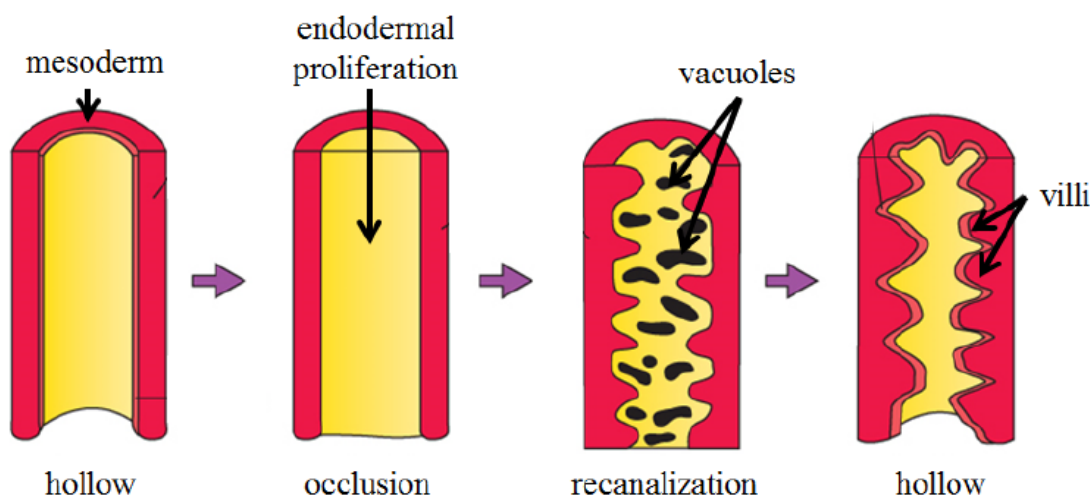


Figura. 5 - Imagem ilustrativa da recanalização do lúmen intestinal. FONTE: LARSEN, W. J. e SCHOENWOLF, G. C. (2009).

Na sequência, esses processos de apoptose e perda de adesão continuam, resultando em espaços entre as células do epitélio pseudoestratificado, chamados de lúmens secundários. Há então uma fusão entre o lúmen primário com o lúmen secundário por volta dos 17 dias de vida intrauterina em ratos. Uma combinação entre a junção dos lúmens, e o contínuo crescimento do mesênquima (tecido mesodérmico situado abaixo do epitélio que dará origem ao tecido conjuntivo) em direção ao lúmen resulta na formação dos pré vilos intestinais (NOAH, DONAHUE e SHROYER, 2011). Esses vilos crescem mantendo na sua base células que irão constituir, no animal adulto, as criptas de Lieberkuhn (glândulas tubulares entre as vilosidades com capacidade proliferativa e que abrigam células secretoras) (CHIN, et al., 2017). Durante esse processo, o epitélio passa a ser colunar simples e à medida que as células das criptas se dividem, elas diferenciam-se e são empurradas em direção ao topo das vilosidades. Uma vez que alcançam o ápice da vilosidade, as células sofrem apoptose (SHYER et al, 2013; MCAVOY e DIXON, 1978). Após a

formação das vilosidades, a proliferação epitelial se restringe às criptas (CHIN, et al, 2017; KORINEK, et al, 1997; BELL, et al, 2013).

Pouco depois do início da formação das vilosidades, o epitélio começa a sofrer diferenciação, dando origem no adulto, às células caliciformes, células enteroendócrinas e enterócitos (SPENCE, LAUF e SHROYER, 2011; VAN DER FLIER e CLEVERS, 2009; NOAH, DONAHUE e SHROYER, 2011; NOAH e SHROYER, 2013).

Após o nascimento, mamíferos imediatamente passam a se alimentar exclusivamente de leite. Em torno do 17º dia de vida de ratos, o leite é gradualmente substituído por alimentos sólidos (HENNING, 1981). Portanto, durante as primeiras três semanas de vida pós-natal, devido à sincronização com os alimentos, as células epiteliais do intestino delgado passam por vários processos morfológicos e fisiológicos de adaptação, incluindo o ritmo circadiano de proliferação celular ou apoptose (SOARES et al., 2009).

3.3. METALOPROTEINASES

As metaloproteinases de matriz (MMPs) pertencem a uma ampla família de endopeptidases dependentes de Zn^{2+} . São sintetizadas por uma variedade de células na forma de zimógenos, que podem ser posteriormente ativados por outras enzimas proteolíticas, ou menos frequentemente, auto-ativados. São reguladas principalmente por uma família de inibidores específicos, os TIMPs (do inglês tissue inhibitor of metalloproteinases) (WOESSNER, 1994; VU e WERB, 2000; MITTAL, et al., 2016).

A família MMP é composta por 28 membros (23 destes expressos em vertebrados), que são classificados de acordo com a estrutura, função e especificidade de substrato, dividindo-se em: collagenases (MMP-1, -8, -13 e -18); gelatinases (MMP-2 e -9); estromelisinases (MMP-3, -10 e -11); matrilisinas (MMP-7 e -26); ligadas à membrana (MMP-MT-14, -15, -16, -17, -23, -24 e -25); e subgrupos não classificados (MMP-12, -19, -20, -21, -27 e -28) (VISSE e NAGASE, 2003; LU, et al., 2011).

De forma geral, as MMPs consistem em quatro domínios (Fig 6), sendo um domínio catalítico, uma região de dobradiça, um pró-domínio N-terminal, e um domínio C-terminal do tipo hemopexina. O domínio catalítico contém dois íons zinco e dois ou três íons cálcio. O primeiro íon Zn^{2+} presente no sítio ativo participa diretamente de processos catalíticos e o segundo íon Zn^{2+} é estrutural. Os íons de cálcio são necessários para estabilizar a estrutura do domínio. Um domínio adicional do tipo âncora transmembranar pode ser encontrado nas MMPs ligadas à membrana (MMPs-MT) (ZITKA et al., 2010; MITTAL, et al., 2016). Diferentes das demais MMPs, as gelatinases possuem três repetições de tipo II de fibronectina em sequência dentro da porção N-terminal do domínio catalítico, região importante para a ligação com proteínas da matriz (STEFFENSEN et al., 1995; SHIPLEY et al., 1996; OVERALL et al., 2000).

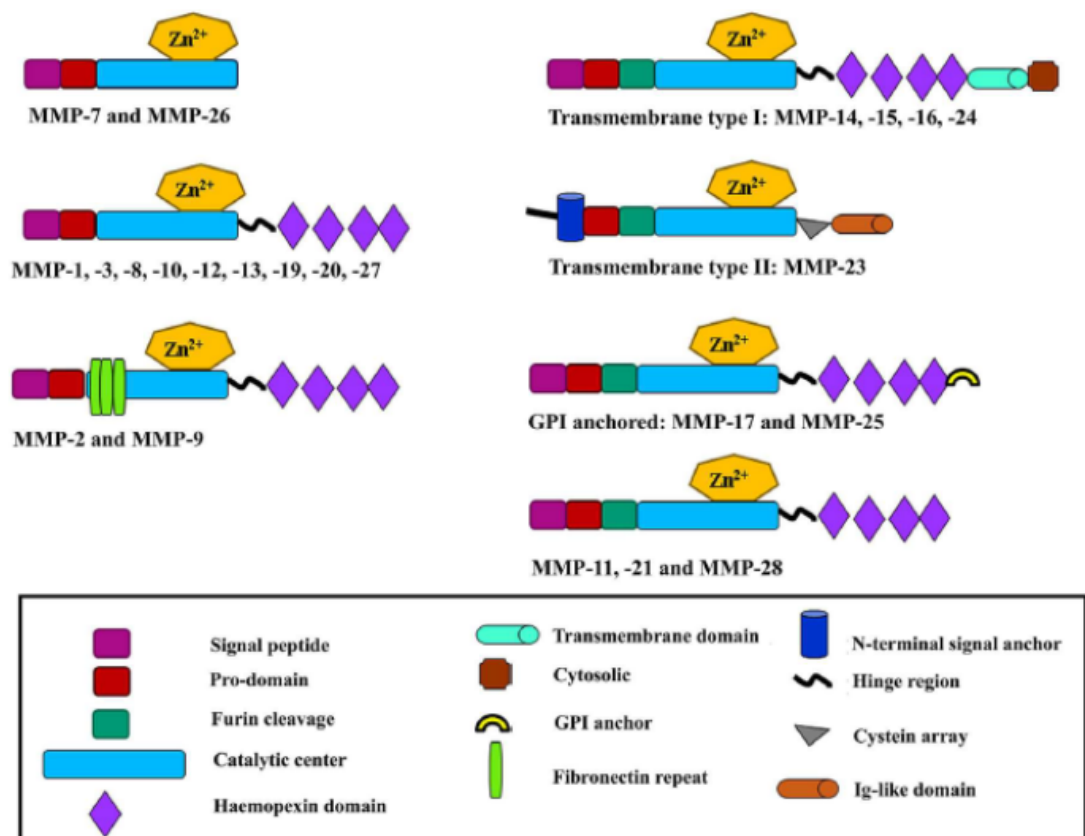


Figura. 6 - Esquema estrutural das MMPs. FONTE: MITTAL et al. (2016).

Essas enzimas são responsáveis pela remodelação tecidual por meio da degradação de componentes da matriz extracelular (MEC) e membranas basais.

Com o avanço das pesquisas na área é cada vez mais evidente a influência das MMPs nas interações célula-célula e célula-matriz e na liberação de fatores de crescimento ligados à matriz extracelular (ZITKA, et al, 2010). Durante o crescimento embrionário e a morfogênese dos tecidos, faz-se necessária a interrupção das barreiras da matriz para permitir os processos de migração celular e a remodelação do microambiente matricial, processos estes que estão ligados à capacidade das MMPs de degradar colágeno e outros componentes estruturais da matriz (VU e WERB, 2000; AMAR, SMITH e FIELDS, 2017).

A MMP-2 (ou gelatinase A) é expressa constitutivamente em quase todos os tecidos (GARG et al., 2009), sendo capaz de hidrolisar colágenos tipo I, IV, V, VII, X e XI, fibronectina, elastina, laminina e outras moléculas. Sua ativação se dá por clivagem autocatalítica na superfície celular, sustentada por um complexo composto por uma metaloproteinase de membrana de tipo 1 (MT1-MMP) associada a um inibidor tecidual de metaloproteinase 2 (TIMP-2) (OVERALL et al., 2000).

A MMP-2 está envolvida em diversas funções fisiológicas e patológicas, incluindo reparação de tecidos (LUO et al., 2018) processos inflamatórios e angiogênese (MITTAL, et al., 2016). Além disso, os papéis de MMP-2 e seus inibidores, TIMP-1 e TIMP-2, em invasão de tumores e metástases são de particular interesse, já que o desequilíbrio entre proteinase e inibidores pode contribuir para a progressão tumoral (CHANG e WERB, 2001). Sua relação com tumores já foi verificada em diferentes órgãos, incluindo o de esôfago e mama (MURRAY et al., 1998; TALVENSAARI-MATTILA et al., 2003).

A MMP-9 (também conhecida como gelatinase-B) é uma proteína sintetizada por uma ampla variedade de células, incluindo: macrófagos, fibroblastos, granulócitos, células T, células dendríticas, células epiteliais, queratinócitos, osteoblastos, mastócitos e possivelmente outras (KANBE, et al., 1999; MITTAL, et al., 2016). É capaz de hidrolisar colágenos tipo III, IV, V e XIV, agreganos, elastinas e entactina. A MMP-9 também é capaz de ativar citocinas e TGF- β e converter plasminogênio em angiostatina (NAGASE, VISSE e MURPHY, 2006; BARROS, 2006, SHIOMI et al., 2010).

A regulação da atividade proteolítica da MMP-9 é necessária para o reparo bem sucedido dos tecidos durante a cicatrização. É rapidamente expressa como uma resposta às lesões, mantendo a alta expressão durante a cicatrização e declinando após a re-epitelização (MAURIS et al., 2014).

Ao contrário da MMP-2, a MMP-9 apresenta um acentuado aumento na sua regulação em resposta à estímulos inflamatórios (NAITO e YOSHIKAWA, 2005; GARG et al., 2009). Em um estudo verificou-se que uma citocina pró-inflamatória, a interleucina 1 beta (IL-1b) foi capaz de induzir a expressão de MMP-9 (OLSZEWSKA et al., 2016).

Hong e colaboradores (2011), descobriram que, em camundongos knockout para MMP-2 e -9 infectados com bactérias Gram-positivas patogênicas, os leucócitos são incapazes de erradicá-las na ausência dessas enzimas. Embora ambas enzimas sejam reguladas no tecido pulmonar de camundongos normais infectados, apenas MMP-9 está presente em leucócitos ativados. Os autores ainda sugerem com esses achados, que MMP-9 auxilia diretamente na fagocitose bacteriana e consequentemente, na defesa do organismo.

Além das funções já citadas, encontramos inúmeros outros trabalhos mostrando a relação entre as MMPs e processos biológicos, como: a regulação da ovulação e ciclo menstrual (CURRY e OSTEEEN, 2003), progressão tumoral (LUO, et. al., 2009; LIU, XIANG e JIA, 2006; MARCHENKO, et. al., 2001; KIM et al. 2013; YU et al., 2014), fibroses (JIROUSKOVA et al., 2012; YU et al., 2012; JARA et al., 2015), escleroses (CHEN et al., 2017), processos inflamatórios (GUTIERREZ-FERNANDEZ et al., 2007; MOON et al., 2008; LI et al., 2009; ACIOGLU et al., 2010; DETWILLER et al., 2013; MARCHANT et al., 2014), desenvolvimento pulmonar (KRALJEVIC, et al, 2015), desenvolvimento renal (LEGALLICIER et al., 2001; ARNOULD et. al. 2009), desenvolvimento neural (AYOUB et al., 2005; AUJLA e HUNTLEY, 2014) e também na metamorfose em anfíbios (HASEBE, et. Al, 2006). MMPs também são alvos de investigações que visam encontrar potenciais biomarcadores ou desenvolver estratégias terapêuticas (GONÇALVES et al., 2009; VANDOOREN et al., 2013; HONG et al., 2015).

Apesar de existirem muitas pesquisas sobre a expressão e atividade das MMPs, bem como suas funções, nota-se que no desenvolvimento e diferenciação do intestino delgado, os estudos sobre MMPs ainda são escassos, o que justifica o seu estudo para melhor compreender o papel dessas enzimas durante o desenvolvimento intestinal aliado às alterações morfológicas e funcionais que ocorrem durante seu crescimento.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O Comitê de Ética em Pesquisa Animal da universidade aprovou o uso dos ratos no estudo. Número do protocolo:12790/2010.

4.1. ANIMAIS

Dois (2) ratos Wistar machos adultos da colônia da Universidade Estadual de Ponta Grossa foram acasalados com cinco (5) fêmeas adultas na proporção de 1: 3 e 1: 2, à noite. Na manhã seguinte, o líquido vaginal foi coletado e espalhado em uma lâmina para detectar a presença de espermatozoides. Duas (2) fêmeas prenhes foram separadas para coletar os fragmentos do intestino delgado dos embriões. Para as análises pós-natal, os filhotes que nasceram das fêmeas restantes amamentaram normalmente até a coleta nas idades determinadas. Todos os ratos foram mantidos sob condições convencionais com ciclo claro / escuro de 12h a 25°C e receberam ração balanceada do Nuvital Brasil e água *ad libitum*.

4.1.1. Coleta das amostras:

Para a coleta do material embrionário as fêmeas prenhes foram brevemente anestesiadas com halotano (Sigma, EUA), mortas por deslocamento cervical e dissecadas para a retirada dos embriões. O intestino total de seis (6) embriões foram coletados no 15º e outros seis no 18º dia de de gestação, 3 para zimografia e 3 para imuno-histoquímica.

Após o nascimento, os filhotes permaneceram com as mães até as idades avaliadas de 3, 10, 17, 25 e 32 dias, onde 3 ratos machos por idade foram anestesiados e mortos por deslocamento cervical para retirada de 2 fragmentos do jejuno (por animal), 1 para a imuno-histoquímica e outro para a zimografia.

4.2. ZIMOGRAFIA

As amostras individuais (n = 3 por tempo avaliado) foram homogeneizadas em 500ul de tampão de extração (Tris-HCl 50mM pH 7,5, CaCl 5mM e NaCl 0,9%). O homogenato resultante foi centrifugado a 15.000g por 15min a 4°C e o sobrenadante coletado foi submetido à quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford (1976). Após a quantificação, 0,1 µg de proteína total de cada amostra foi diluída em tampão Laemmli não reduzido e submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida a

12%, contendo 5% de gelatina, por 3 h. Os geis foram então lavados duas vezes (15 minutos cada) em 2,5% de Triton X-100 sob agitação e em seguida imersos em tampão de ativação (CaCl 2 M; HCl 1M) durante 16 horas a 37 °C. Por fim, os géis foram corados com Comassie Blue e imersos em solução descorante até que as bandas da gelatina degradada fossem visíveis. Para fins de demonstração dos resultados, 3 amostras por idade (com quantidades iguais de proteína total) foram misturadas para a produção de um gel representativo dos resultados. O mesmo se deu para os testes de inibição descritos a seguir.

4.2.1. Testes de inibição de proteases:

Para confirmar a natureza das MMPs, testes de inibição foram aplicados ao gel adicionando 1,10-fenantrolina e EDTA 5mM (inibidores de MMPs); iodoacetamida 1mM (inibidor de cisteínases) ou fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 2mM (inibidor de serinases) ao tampão de ativação.

4.3. PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS

Em cada embrião (n = 3) foi realizada uma secção transversal ao nível torácico antes da imersão em paraformaldeído 4% onde permaneceram por 48 horas. Após o nascimento, os fragmentos de jejuno obtidos para as análises histológicas foram imersos em paraformaldeído a 4% / tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, por 48 h. As amostras foram desidratadas em soluções crescentes de etanol (70% a 100%), por 60 minutos cada, à temperatura ambiente, e diafanizados em xilol, por 2 vezes, por 30 minutos cada, à temperatura ambiente. O material foi emblocado em parafina e os blocos foram seccionados em micrótomo para obter cortes longitudinais semisseriados de 5 µm que foram montados em lâminas silanizadas. As lâminas seguiram então para os procedimentos imuno-histoquímicos e histoquímicos.

4.3.1. Imuno-histoquímica para MMP-9 e MMP-2

Para esta análise, as lâminas contendo 3 cortes cada foram desparafinadas em xilol, reidratadas em soluções alcoólicas decrescentes (100% a 70%) e submetidas à recuperação antingênica em EDTA 1mM pH 8,0 a 98°C por 20 minutos. Depois disso, os cortes foram tratados 3 vezes em peróxido de hidrogênio a 2% por 15 minutos cada, para inibir a atividade da peroxidase endógena. Os cortes foram lavados em água e 1xPBS (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 4,3

mM; KH_2PO_4 1,47 mM, pH 7,4) e incubados em BSA (albumina de soro bovino) 3% por 1 h em temperatura ambiente para bloquear ligações inespecíficas. Após o bloqueio os cortes foram lavados em PBS e incubados por 14 horas com anticorpos primários anti-MMP-2 (MAB 13405) e anti-MMP-9 monoclonal (Millipore NG1865055) ambos nas concentrações de: 1: 250 diluídos em PBS contendo 1% de BSA. Os cortes foram então lavados em PBS e incubados com anticorpo secundário utilizando DAKO (kit Universal LSAB) durante 30 min a 37°C em cada solução. Após lavagem em PBS, os cortes foram incubados em uma solução de 80 ml de PBS contendo 25mg de 3,3 diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich), 1 ml de H_2O_2 20 volumes e 1 ml de DMSO. O tempo de reação foi de 5 minutos, à temperatura ambiente. Os cortes foram lavados em água destilada e contracorados com hematoxilina de Harris por 1 minuto. Após coloração, os cortes foram desidratados e montados com lâminulas usando Permount.

Em cada lâmina dois cortes foram incubados com anticorpo e um corte foi usado como controle negativo, omitido o anticorpo primário. Também foram empregados controles positivos usando cortes de região odontogênica para cada anticorpo, os quais foram submetidos às mesmas condições dos cortes experimentais mas que não são mostrados nos resultados.

4.3.2. Histoquímica para identificação de células

Lâminas contendo cortes de jejuno de ratos com 3, 10, 17, 25 e 32 dias após o nascimento foram desparafinadas e submetidas à coloração Tricrômico de Masson para evidenciar grânulos celulares. Após a coloração as lâminas foram desidratadas, diafanizadas e montadas para análise em microscopia de luz.

5. RESULTADOS

De acordo com os resultados do zimograma, demonstrados na Figura 7 A, não houve atividade proteolítica de degradação da gelatina durante o período intrauterino de 15 e 18 dias. Os resultados da imuno-histoquímica apresentada na Figura 8 A, B, D e E nos tempos de 15 e 18 dias de vida intrauterina não evidenciaram a presença de imuno-marcação para MMP-2 e MMP-9.

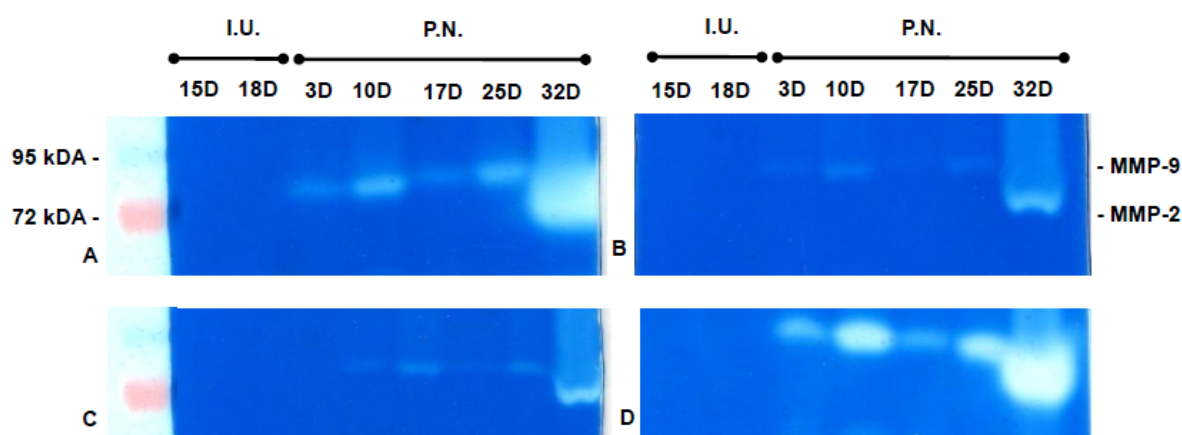


Figura 7: Zimogramas 0,1µg de proteína total para atividade enzimática de MMP-9 e MMMP-2 presentes no intestino delgado de embriões com 15 e 18 dias de vida intrauterina, e de ratos com 3, 10, 17, 25, e 32 dias após o nascimento. (A) Atividade normal; (B) Fenantroline 5mM; (C) PMSF 2mM; (D) Iodoacetamida 1mM. (I.U.) intrauterino; (P.N.) pós-natal.

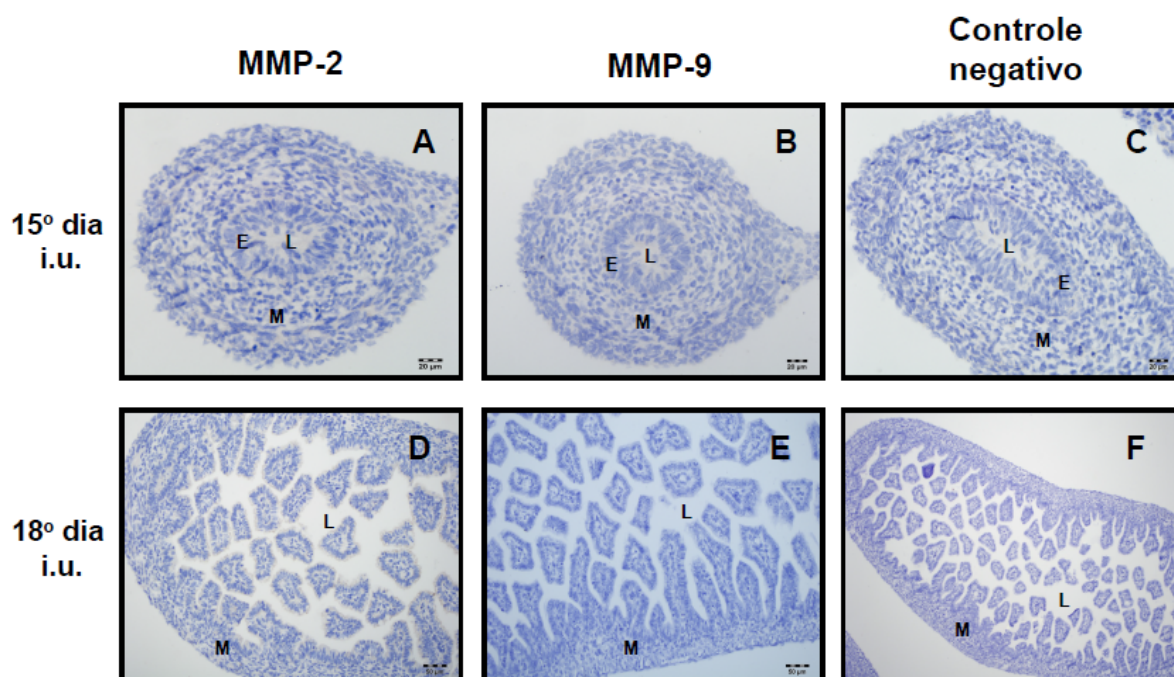


Figura 8: Imunohistoquímica para MMP-2 e MMP-9 no intestino delgado de embriões de ratos com: 15 dias e 18 dias de vida intra-uterina (i.u.). (L) lúmen, (E) epitélio, (M) mesênquima.

Os resultados da zimografia para os tempos avaliados após o nascimento: 3 e 10 dias (período de amamentação), 17 dias (pré-desmame), 25 dias (desmame) e 32 dias (pós-desmame) são apresentados na Figura 7 A. O teste inibitório para MMP, serinases e cisteinases são demonstradas em B, C e D, respectivamente.

Em todos os tempos avaliados foi possível detectar (Fig. 7A) uma atividade proteolítica em torno de 90 kDA correspondente ao peso molecular da MMP-9. Por volta de 72 kDA (que corresponde à MMP-2), apenas uma degradação da banda de gelatina foi detectada no 32º dia.

No entanto, após o uso da fenantrolina mais EDTA (Fig. 7B), bem como do PMSF (Fig. 7C) que são inibidores de MMP e serinase, respectivamente, os resultados mostraram um efeito inibitório sobre a atividade proteolítica nos níveis de 90 kDA e 72 kDA em todos os tempos avaliados. A iodoacetamida, que é um inibidor de cisteinases (Figura 7 D), não foi capaz de inibir a atividade proteolítica das amostras do intestino delgado em nenhum tempo avaliado.

Por outro lado, a imuno-histoquímica para MMP-9 e MMP-2 demonstrada na Figura 9, corrobora com os resultados obtidos anteriormente pelo método de zimografia. A MMP-2 não foi detectada em nenhum dos tempos avaliados (3º, 10º, 17º, 25º e 32º dia) como mostrado na Figura 9, em A, B, C, D e G. A MMP-9, no entanto, foi imunolocalizada no citoplasma das células caliciformes nas vilosidades (seta - Fig 9 F' e G'), no 3º e 10º dia, mas não nos próximos 17º, 25º e 32º dias avaliados. A MMP-9 também foi detectada no citoplasma das células presentes no tecido conjuntivo, localizadas abaixo do epitélio das vilosidades, em todos os tempos avaliados na vida pós-natal, conforme indicado pelas cabeças de setas na Figura 9, das imagens F', G', H', I' e J'.

Para identificar quais células expressavam MMP-9 na lâmina própria, foi realizada uma coloração de Tricrômico de Masson, que mostrou a presença de mastócitos (cabeças de setas) distribuídos no centro das vilosidades, próximo às células epiteliais e ao redor das glândulas mucosas. Os mastócitos não foram identificados com 3 dias de vida, mas apenas a partir do 10º dia após o nascimento (Fig. 10 de A-E).

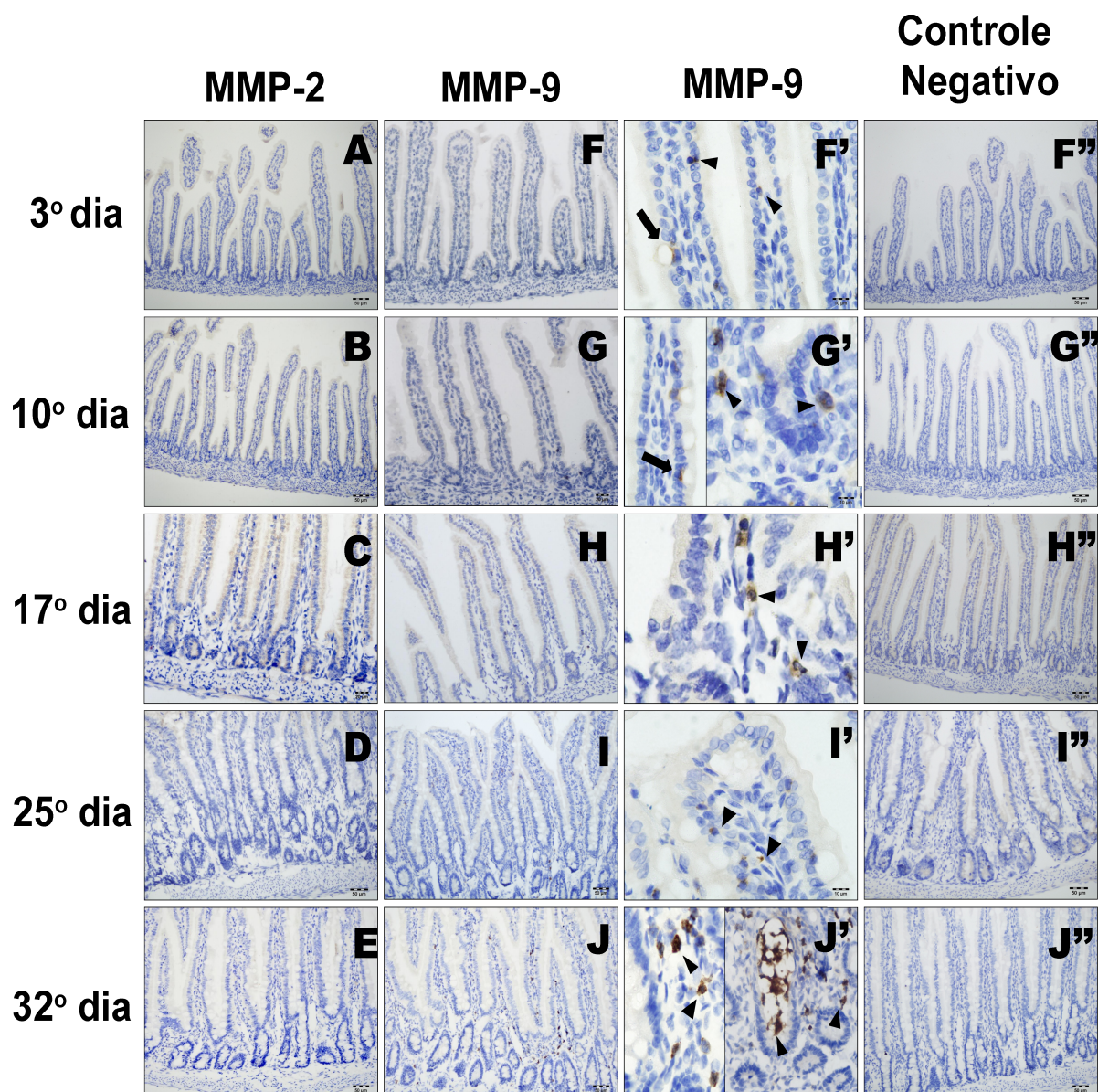


Figura 9: Imuno-histoquímica no jejuno de ratos para MMP-2 (A-E), e MMP-9 (F-J') nos tempo após o nascimento: 3, 10, 17, 25 e 32 dias. Controle negativo da reação (F''- J''). Células do conjuntivo marcadas próximo ao epitélio (cabeças de seta), células caliciformes marcadas (setas).

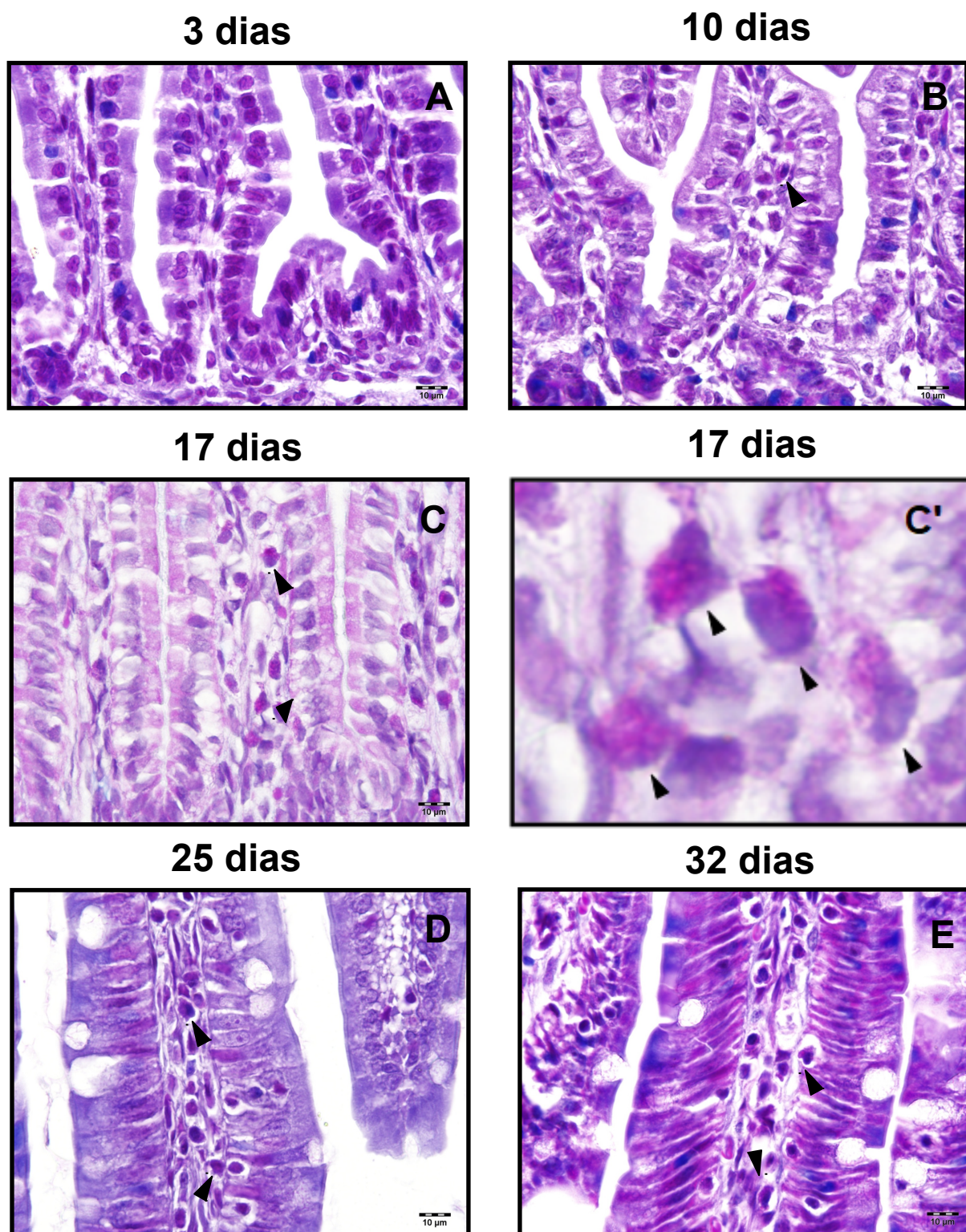


Figura. 10 - Fotomicrografia de mastócitos na lâmina própria do jejuno. 3 dias (A), 10 dias (B), 17 dias (C e detalhe C'), 25 dias (E) e 32 dia (F) após o nascimento. Mastócitos (cabeça de seta). Coloração Tricrômico de Masson.

6. DISCUSSÃO

O intestino delgado é um órgão vital para a homeostase dos sistemas do corpo, porque todos os nutrientes, essenciais para o metabolismo celular, são absorvidos pelo organismo no intestino delgado, além desse órgão constituir uma barreira entre o lúmen intestinal e o restante do corpo (DE MEY e FREUND, 2013). No entanto, durante todas as fases de desenvolvimento, o intestino delgado está sob influência dos fatores externos, sendo os principais a luz e o alimento (SOARES et al., 2009). Em mamíferos, o primeiro alimento após o nascimento é o leite, e essa fase é definida como fase de amamentação, que no rato termina em torno do 17º dia de vida pós-natal. Após esse período, o animal passa para a fase de desmame, quando o hábito alimentar se diversifica, resultando em várias adaptações quanto às funções morfofisiológicas do intestino delgado que são definidas para a sua funcionalidade na vida adulta.

Por outro lado, neste trabalho investigamos, durante o desenvolvimento do intestino delgado de ratos, desde a vida intrauterina até a idade adulta, como era o perfil da atividade e expressão da gelatinase A (MMP-2) e gelatinase B (MMP-9). Sabe-se que a MMP-2 e a MMP-9 estão envolvidas no processo de remodelação e sinalização na matriz extracelular, como a modulação dos fatores de crescimento biológico durante o crescimento, bem como a proliferação celular em um reparo normal do tecido ou durante a progressão de várias doenças degenerativas (STAMENKOVIC 2003; PHILLIPS et al., 2017; NAWAZ et al., 2018). Para realizar essas funções, as MMPs são ativamente expressas por diferentes tipos celulares, como queratinócitos, células endoteliais, fibroblastos, condroblastos, células do sistema imune e células de Schwann (CHATTOPADHYAY e SHUBAYEV 2009; ZAMBUZZI et al., 2009; VAILLANT et al., 2003).

Durante o desenvolvimento dos órgãos, a expressão de MMPs foi demonstrada em diferentes modelos animais (QUICK et al., 2012; FENG et al., 2012; JAFARI et al., 2010). No entanto, quanto à expressão de MMPs durante o desenvolvimento de intestino delgado de mamíferos (da fase intrauterina até a idade adulta), as descrições ainda são escassas. Camargo et al., (2016) demonstraram que MT1-MMP (uma MMP ancorada na membrana celular) é expressa pelas células epiteliais do intestino delgado, durante todas as fases da vida intra-uterina e pós-natal.

Portanto, hipotetizou-se que a MMP-2 e a MMP-9 também poderiam ser expressas durante a morfogênese do intestino delgado no epitélio intestinal, considerando as fases intrauterina, de amamentação e de desmame, que são descritas como importantes janelas morfofuncionais do desenvolvimento intestinal. Em especial, a demonstração anterior da presença da MT1-MMP sugere uma possível expressão de MMP-2, pois a MMP-2 só é ativada na presença do MT1-MMP (MURPHY et al., 1999).

Ao contrário da MT1-MMP evidenciada anteriormente no epitélio intestinal em todas as idades avaliadas (CAMARGO et al, 2016), os resultados obtidos nesse trabalho mostraram que não há expressão da MMP-2 e MMP-9 pelas células epiteliais do intestino delgado nas fases de vida intrauterina avaliadas. Esse resultado indica que estas gelatinases (MMP-2 e MMP-9) diferentemente da MT1-MMP parecem não ter papel relevante durante a morfogênese do epitélio do intestino delgado durante a vida intrauterina. Embora após o nascimento, no zimograma houvesse uma degradação da banda de gelatina correspondente à MMP-2, esta MMP não foi detectada por imuno-histoquímica no epitélio em nenhum dos tempos avaliados. Entretanto, o zimograma mostra uma atividade de MMP-9 e após a imuno-histoquímica ela foi localizada de forma mais evidente apenas nas células presentes na lâmina própria. Portanto, os resultados obtidos mostraram que a MMP-2 e MMP-9 não estão presentes em nenhuma das fases do desenvolvimento do intestino delgado avaliadas no trabalho e, considerando o trabalho anterior descrito por Camargo et.al (2016), sugere-se que a MT1-MMP pode ter o papel principal durante o remodelamento da camada epitelial do intestino delgado.

Com relação à expressão de MMP-9, esta foi detectada no zimograma em todos os tempos avaliados, entretanto, quando as amostras foram submetidas a diferentes inibidores, o resultado mostrou uma inibição efetiva para MMP e serinases, mas não para cisteinases. Ao contrário do que hipotetizamos, que as MMPs poderiam ser expressas pelas células epiteliais, a imuno-histoquímica mostrou apenas a presença das MMP-9 nas células caliciformes mas não em todas as células epiteliais. A MMP-9 foi detectada também em células presentes na lâmina própria. Os resultados adicionais obtidos para identificar quais células estavam

expressando MMP-9 na lâmina própria mostram a presença de mastócitos coincidindo com as células marcadas para MMP-9 na imuno-histoquímica.

De fato, a MMP-9 já foi descrita como uma das várias moléculas farmacológicas sintetizadas pelos mastócitos, incluindo a quimase e a triptase (duas serinases), que são as principais proteínas presentes nos grânulos dos mastócitos (KATUNUMA e KIDO, 1988; LEES et al., 1994). Essas enzimas também atuam na degradação de componentes estruturais da matriz extracelular, como o colágeno IV. Também foi demonstrado que a quimase dos mastócitos está envolvida na permeabilidade das células epiteliais, alterando a distribuição das proteínas das junções de oclusão (SCUDAMORE et al., 1988). Portanto, a presença dessas serinases nos mastócitos pode explicar porque o teste inibitório com PMSF mostrou inibição, bem como, pode explicar a presença de várias células com características de mastócitos marcadas para MMP-9 localizadas próximas às células epiteliais, observadas no presente estudo.

Até o momento, várias funções biológicas para a presença de mastócitos na parede gastrointestinal de animais adultos foram relatadas, como reações alérgicas a alimentos, contração do músculo liso e peristaltismo, secreção de ácido, eletrólitos e mucinas pelas células epiteliais, além de defesa do hospedeiro contra bactérias, vírus ou parasitas (BISCHOFF, 2009). Além disso, nos últimos anos, o papel dos mastócitos e de suas moléculas farmacológicas sobre os efeitos inflamatórios, bem como na imunidade adaptativa e, especialmente na inata, tem sido discutido (PEJLER et al., 2010; DOUAIHER et al 2014; CARDAMONE et al., 2016; PASTWIŃSKA et al 2017; XU et al., 2018). A ativação da pró-MMP-9 foi demonstrada *in vitro* na presença da mastócito-protease-4 de camundongo (mMCP-4) obtida de cultura derivada da medula óssea (TCHOUGOUNOVA et al., 2005; LIN et al., 2011) o que indica um papel relevante da expressão de MMP-9 nos mastócitos presentes na lâmina própria do intestino delgado.

Entretanto, apesar do conhecimento existente sobre mastócitos e sua presença em vários órgãos, incluindo o intestino delgado, não foi encontrado, até a escrita deste trabalho, nenhum relato sobre a presença dos mastócitos considerando as fases do desenvolvimento do intestino delgado conforme mostrado nesse estudo. Como mastócitos expressando MMP-9 foram detectados a partir do 10º dia após o

nascimento, sugerimos que essa MMP possa estar envolvida no remodelamento da matriz extracelular mas principalmente na defesa imunológica inata conforme já descrito em outros trabalhos, no caso de processos inflamatórios, porém, essa hipótese ainda precisa ser confirmada em experimentos futuros.

7. CONCLUSÃO

Podemos concluir que, em relação ao desenvolvimento do intestino delgado de ratos:

- A MMP-2 e a MMP-9 não foram expressas no 15º e 18º dia de vida intrauterina.

- A MMP-2 não foi expressa em nenhuma das fases pós-natais estudadas nesse trabalho.

- A MMP-9 é expressa nas células caliciformes e em mastócitos após o nascimento.

- As metaloproteinases MMP-2 e -9 parecem não ter uma relação direta com a morfogênese do intestino delgado nas fases estudadas nesse trabalho.

REFERÊNCIAS

- ACIOGLU E, YIGIT O, ALKAN Z, SERVER EA, UZUN H, GELISGEN R. The role of matrix metalloproteinases in recurrent tonsillitis. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol** 74:535–539, 2010.
- AMAR, S.; SMITH, L.; FIELDS G. B. Matrix metalloproteinase collagenolysis in health and disease. **BBA – Mol Cell Research** 1864, 1940–1951, 2017.
- ARNOULD, C., LELIÈVRE-PÉGORIER, M., RONCO, P., LELONGT, B. MMP9 limits apoptosis and stimulates branching morphogenesis during kidney development. **J. Am Soc Nephrol.** 20, 2171–2180. , 2009.
- AUJLA, P.K., HUNTLEY, G.W. Early postnatal expression and localization of matrix metalloproteinases 2 and 9 during establishment of rat hippocampal synaptic circuitry. **J Comp Neurol.** 522, 1249–1263., 2014.
- AYOUB, A.E., CAI, T.Q., KAPLAN, R.A., LUO, J. Developmental expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and their potential role in the histogenesis of the cerebellar cortex. **J Comp Neurol.** 481, 403–415., 2005.
- BARBARA, P. DE S.; BRINK, G. R. VAN DEN; ROBERTS, D. J. Development and differentiation of the intestinal epithelium. **CMLS, Cell. Mol. Life Sci.** 60, 1322–1332, 2003.
- BARROS, S. S. L. V. Expressão imunohistoquímica de metaloproteinases em carcinoma epi- dermoide de lábio inferior e língua. 2006. 130 f. Tese (Doutorado em Patologia Oral), Universi- dade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, 2006.
- BELL, S.M.; ZHANG, L.; XU, Y.; BESNARD, V.; WERT, S.E.; SHROYER, N.; et al. Kruppel-like factor 5 controls villus formation and initiation ofcytodifferentiation in the embryonic intestinal epithelium, **Dev Biol.** 375, 128–139, 2013.
- BISCHOFF SC. Physiological and pathophysiological functions of intestinal mast cells. **Semin Immunopathol.** 31(2):185-205., 2009.
- CAMARGO, K.C.; GOMES, J.R.; LODDI, M.M.; SORDI, R. DE; COSTA-AYUB, C.L.S.; SOARES, M.A. DE M. MT1-MMP and its potential role in the vertebrate intestinal morphogenesis. **Acta Histochemica** 118. 729–735., 2016.
- CARDAMONE C1, PARENTE R1, FEO GD1, TRIGGIANI M2. Mast cells as effector cells of innate immunity and regulators of adaptive immunity. **Immunol Lett.** 178:10-4. 2016.07.003., 2016.

CHATTOPADHYAY, S.; SHUBAYEV, V. I. MMP-9 controls Schwann cell proliferation and phenotypic remodeling via IGF-1 and ErbB receptor-mediated activation of MEK/ERK pathway. **Glia**. 57:1316–1325, 2009.

CHANG C, WERB Z. The many faces of metalloproteases: Cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. **Trends Cell Biol** 11:S37–S43., 2001.

CHEN, X.; QIN, Y.; ZHOU, T.; JIANG, L.; LEI, F.; QIN, H.; ZHANG, L.; ZHOU, Z. The potential role of retinoic acid receptor α on glomerulosclerosis in rats and podocytes injury is associated with the induction of MMP2 and MMP9. **Acta Biochim Biophys Sin**, 49(8), 669–679, 2017.

CHIN, A. M.; HILL, D. R.; AURORA, M.; SPENCE, J. R. Morphogenesis and maturation of the embryonic and postnatal intestine, **Semin Cell Dev Biol**, 2017.

CHU, H.; PAZGIER, M.; JUNG, G.; NUCCIO, S.-P.; CASTILLO, P.A.; JONG, M.F. DE, et al., Human α -defensin 6 promotes mucosal innate immunity through self-assembled peptide nanonets. **Science** (New York N.Y.) 337, 477–481. 2012.

CLEVERS, H.C.; BEVINS, C.L.; Paneth cells: maestros of the small intestinal crypts, **Annu. Rev Physiol**. 75, 289–311. 2013.

CURRY, T.E.; OSTEEN, K.G. The matrix metalloproteinase system: Changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. **Endocr Rev.**, 24(4), 428-465. 2003.

DAUÇA, M.; BOUZIGES, F.; COLIN, S. et al. Development of the vertebrate small intestine and mechanisms of cell differentiation. **Intestinal Cell Differentiation J Dev Biol**. 34:205-218, 1990.

DE MEY, JR.; FREUND JN. Understanding epithelial homeostasis in the intestine: An old battlefield of ideas, recent breakthroughs and remaining controversies. **Tissue Barriers**. 1;1(2):e24965., 2013.

DEGLINCERTI, A.; CROFT, G.F.; PIETILA, L.N.; ZERNICKA-GOETZ, M.; SIGGIA, E.D.; BRIVANLOU, A.H. Self-organization of the in vitro attached human embryo, **Nature** 533 251–254. 2016.

DETWILLER KY, SMITH TL, MACE JC, TRUNE DR, SAUTTER NB. Steroid-independent upregulation of matrix metalloproteinase 9 in chronic rhinosinusitis patients with radiographic evidence of osteitis. **Int Forum Allergy Rhinol** 3:364–368. 2013.

DOUAIHER, J.; SUCCAR, J. LANCEROTTO, L.; GURISH, M. F.; ORGILL, D. P.; HAMILTON, M. J.; KRILIS, S. A.; STEVENS, R. L. Chapter Six - Development of Mast Cells and Importance of Their Tryptase and Chymase Serine Proteases in Inflammation and Wound Healing. **Advances in Immunology**. Vol 122, p211-252. 2014.

FENG J, MCDANIEL JS, CHUANG HH, HUANG O, RAKIAN A, XU X, STEFFENSEN B, DONLY KJ, MACDOUGALL M, CHEN S. Binding of amelogenin to MMP-9 and their co-expression in developing mouse teeth. **J Mol Histol.** 43(5):473-85, 2012.

GARG, P.; VIJAY-KUMAR, M.; WANG, L. et al. Matrix metalloproteinase-9-mediated tissue injury overrides the protective effect of matrix metalloproteinase-2 during colitis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 296: 75–184, 2009.

GOLDSTEIN R, KLEIN T, FREIER S, MENCZEL J. Alkaline phosphatase and disaccharidase activities in the rat intestine from birth to weaning. I. Effect of diet on enzyme development. **Am J Clin Nutr.** 24(10):1224-31. 1971.

GOMES, J.R., OMAR, N.F., DOS SANTOS NEVES, J. Increase of MT1-MMP, TIMP-2 and Ki-67 proteins in the odontogenic region of the rat incisor post-shortening procedure. **J Mol Hist.** 41: 333, 2010.

GOMES, J. R.; AYUB, L. C.; REIS, C. A. dos; SILVA, M. J. da; OMAR, N. F.; SOARES, M. A. M. Goblet cells and intestinal Alkaline phosphatase expression (IAP)during the development of the rat small intestine. **Acta Histochemica** 119. 71–77, 2016.

GOMES JR, OMAR NF, NEVES JDS, NOVAES PD. Doxycycline reduces the expressionand activity of matrix metalloproteinase-2 in the periodontal ligament of the ratincisor without altering the eruption process. **J Periodont Res**, 52: 353–359. 2017.

GONÇALVES F. M., JACOB-FERREIRA A. L.B., GOMES V. A., CASELLA-FILHO A., CHAGAS A. C.P., MARCACCINI , A. M.; GERLACH R. F., TANUS-SANTOS J. E. Increased circulating levels of matrix metalloproteinase (MMP)-8, MMP-9, and pro-inflammatory markers in patients with metabolic syndrome. **Clinica Chimica Acta** 403, 173–177. 2009.

GUEN, L. LE; MARCHAL, S.; FAURE, S.; SANTA BARBARA, P. DE. Mesenchymal-epithelialinteractions during digestive tract development and epithelial stem cellregeneration, **Cell Mol Life Sci** 72, 3883–3896, 2015.

GUTIERREZ-FERNANDEZ A, INADA M, BALBÍN M, FUEYO A, PITIOT AS, ASTUDILLO, HIROSE K, HIRATA M, SHAPIRO SD, NOEL A, WERB Z, KRANE SM, LOPEZ-OTIN C, PUENTE XS. Increased inflammation delays wound healing in mice deficient in collagenase-2 (MMP-8). **FASEB J** 21:2580–2591., 2007.

HASEBE, T., HARTMAN, R., MATSUDA, H., SHI, Y.B. Spatial and temporal expression profiles suggest the involvement of gelatinase A and membrane type 1 matrix metalloproteinase in amphibian metamorphosis. **Cell Tissue Res.** 324, 105–116., 2006.

HELANDER, H.F.; FÄNDRIKS, L. Surface area of the digestive tract—revisited. **Scand J Gastroenterol.** 49, 681–689, 2014.

HENNING, S.J. Postnatal development: coordination of feeding, digestion and metabolism. **Am J Physiol.** 241 (3), G199–214, 1981.

HOLMBECK K, BIANCO P, CATERINA J, YAMADA S, KROMER M, KUZNETSOV SA. MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. **Cell.** 99:81–92, 1999.

HONG, JS.; GREENLEE, K. J.; PITCHUMANI, R.; LEE, S-H.; SONG, L.; SHAN, M.; CHANG, S. H.; PARK, P. W.; DONG, C.; WERB, Z.; BIDANI, A.; CORRY, D. B.; KHERADMAND, F. Dual Protective Mechanisms of Matrix Metalloproteinases 2 and 9 in Immune Defense against *Streptococcus pneumoniae*. **J Immunol.** 1;186(11):6427–36, 2011.

HONG JM, KWON OK, SHIN IS, SONG HH, SHIN NR, JEON CM, OH R, HAN SB, AHN KS. Antiinflammatory activities of *Physalis alkekengi* var. *franchetii* extract through the inhibition of MMP-9 and AP-1 activation. **Immunobiology**, 220:1–9, 2015.

JAFARI, G.; BURGHOORN J, KAWANO T, MATHEW M, MÖRCK C, AXÄNG C, AILION M, THOMAS JH, CULOTTI JG, SWOBODA P, PILON M. Genetics of extracellular matrix remodeling during organ growth using the *Caenorhabditis elegans* pharynx model. **Genetics.** 186(3):969–82, 2010.

JARA P, CALYECA J, ROMERO Y, PLACIDO L, YU G, KAMINSKI N, MALDONADO V, CISNEROS J, SELMAN M, PARDO A. Matrix metalloproteinase (MMP)-19-deficient fibroblasts display a profibrotic phenotype. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 308:L511–L522., 2015.

JIROUSKOVA M, ZBODAKOVA O, GREGOR M, CHALUPSKY K, SARNOVA L, HAJDUCH M, EHRMANN J, JIRKOVSKA M, SEDIACEK R. Hepatoprotective effect of MMP-19 deficiency in a mouse model of chronic liver fibrosis. **PloS ONE**, 7:e46271., 2012.

KANBE, N.; TANAKA¹, A.; KANBE, M.; ITAKURA, A.; KUROSAWA, M.; MATSUDA, H. Human mast cells produce matrix metalloproteinase 9. **Eur J Immunol.** 29: 2645–2649, 1999.

KARARLI, T. T. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, vol. 16, 351–380., 1995.

KARLSSON, L.; LINDAHL, P.; HEATH, J.; BETSHOLTZ, C. Abnormal gastrointestinal development in PDGF-A and PDGFR-(alpha) deficient mice implicates a novel mesenchymal structure with putative instructive properties, **Development.** Aug;127(16):3457–66. 2000.

KATUNUMA, N; KIDO H. Biological functions of serine proteases in mast cells in allergic inflammation. **J Cell Biochem.** 38(4):291-301., 1988.

KIM JM, KIM HJ, KOO BS, RHA KS, YOON YH. Expression of matrix metalloproteinase-12 is correlated with extracapsular spread of tumor from nodes with metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. **Eur Arch Otorhinolaryngol**, 270:1137–1142, 2013.

KORINEK, V.; BARKER, N.; MORIN, P.J.; VAN WICHEN, D.; WEGER, R. DE; KINZLER, K.W., et al., Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma, **Science** (New York N.Y.) 275 1784–1787. 1997.

KRALJEVIC, D., VUKOJEVIC, K., KARAN, D., RAJIC, B., TODOROVIC, J., MISKOVIC, J., TOMIC, V., KORDIC, M., SOLJIC, V. Proliferation, apoptosis and expression of matrix metalloproteinase-9 in human fetal lung. **Acta Histochem.** 117, 92–103, 2015.

KURAKATA, H.; OKA, M.; MATSUBARA, Y. et al. Developmentally regulated expression of matrix metalloproteinases during fetal rat colon morphogenesis. **Develop Growth Differ.** 50, 41– 48, 2008.

LEES M1, TAYLOR DJ, WOOLLEY DE. Mast cell proteinases activate precursor forms of collagenase and stromelysin, but not of gelatinases A and B. **Eur J Biochem.** 1;223(1):171-7., 1994.

LEGALICIER, B., TRUGNAN, G., MURPHY, G., LELONGT, B., RONCO, P. Expression of the type collagenase system during mouse kidney development and tubule segmentation. **J Am Soc Nephrol.** 12, 2358–2369. 2001.

LEWIS, S.L.; TAM, P.P.L. Definitive endoderm of the mouse embryo: formation, cell fates, and morphogenetic function, **Dev Dyn.** 235, 2315–2329, 2006.

LI W, LI J, WU Y, RANCATI F, VALLESE S, RAVEGLIA L, WU J, HOTCHANDANI R, FULLER N, CUNNINGHAM K, MORGAN P, FISH S, KRYKBAEV R, XU X, TAM S, GOLDMAN SJ, ABRAHAM W, WILLIAMS C, SYPEK J, MANSOUR TS. Identification of an orally efficacious matrix metalloprotease 12 inhibitor for potential treatment of asthma. **J Med Chem.** 52:5408–5419., 2009.

LIN L, BANKAITIS E, HEIMBACH L, LI N, ABRINK M, PEJLER G. Dual targets for mouse mast cell protease-4 in mediating tissue damage in experimental bullous pemphigoid. **The Journal of Biological Chemistry.** 286:37358–37367., 2011.

LIU, W.; XIANG, C.; JIA, S. Study on the expression of matrix metalloproteinase-12 and NM_002426 in squamous laryngeal carcinoma. **Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi** 20:1120–1123., 2006.

LOUVARD D, KEDINGER M, HAURI HP, KEDINGER H. The differentiating intestinal epithelial cell: establishment and maintenance of functions through interactions between cellular structures. **Annu Rev Cell Biol.** 8:157-95. 1992.

LU, P.; TAKAI, K.; WEAVER, V. M.; WERB Z. ExtracellularMatrix Degradation and Remodeling in Development and Disease. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** v.3(12), 2011.

LUO YP, ZHONG M, WANG LP, ZHONG M, SUN GQ, LI J. Inhibitory effects of RNA interference on MMP-24 expression and invasiveness of ovarian cancer SKOV(3) cells. **Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao** 29:781–784., 2009.

LUO, F.; TRAN, A. P.; XIN, L.; SANAPALA, C., LANG, B. T., SILVER, J.; YANG, Y. Modulation of proteoglycan receptor PTP σ enhances MMP-2 activity to promote recovery from multiple sclerosis. **Nat Comu** 9:4126, 2018.

MARCHENKO, GN.; RATNIKOV, BI.; ROZANOV, DV.; GODZIK, A.; DERYUGINA, EI.; STRONGIN, AY. Characterization of matrix metalloproteinase-26, a novel metalloproteinase widely expressed in cancer cells of epithelial origin. **Biochem J** 356:705–718., 2001.

MARCHANT DJ, BELLAC CL, MORAES TJ, WADSWORTH SJ, DUFOUR A, BUTLER GS, BILAWCHUK LM, HENDRY RG, ROBERSTON AG, CHEUNG CT, NG J, ANG L, LUO Z, HEIBRON K, NORRIS MJ, DUAN W, BUCYK T, KARPOV A, DEVEL L, GEORGIADIS D, HEGELE RG, LUO H, GRANVILLE DJ, DIVE V, MCMANUS BM, OVERALL CM. A new transcriptional role for matrix metalloproteinase-12 in antiviral immunity. **Nat Med** 20:493–502, 2014.

MAURIS J, WOODWARD AM, CAO Z, PANJWANI N, ARGUESO P. Molecular basis for MMP-9 induction and disruption of epithelial cell-cell contacts by galectin-3. **Journal Cell Sci** 127:3141–3148. 2014.

MCAVOY, J.W.; DIXON, K.E. Cell specialization in the small intestinal epithelium of adult *Xenopus laevis*: structural aspects, **J Anat.** 125, 155–169, 1978.

MITTAL, R.; PATEL, A. P.; DEBS, L. H.; NGUYEN, D.; PATEL, K.; GRATI, M'H.; MITTAL, J.; YAN, D.; CHAPAGAIN, P.; LIU, X. Z. Intricate Functions of Matrix Metalloproteinases in Physiological and Pathological Conditions. **J Cell Physiol.** 231: 2599–2621, 2016.

MOON SK, LINTHICUM JR FH, YANG HD, LEE SJ, PARK K. Activities of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in idiopathic hemotympanum and otitis media with effusion. **Acta Otolaryngol** 128:144–150., 2008.

MURRAY, G. I.; DUNCAN, M. E.; O'NEIL,P.; MCKAY, J. A.; MELVIN, W. T.; FOTHERGIL, J. E. Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in oesophageal cancer. **J of pathology.** Vol.185:256–261, 1998.

MURPHY G1, STANTON H, COWELL S, BUTLER G, KNÄUPER V, ATKINSON S, GAVRILOVIC J. Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. **APMIS**. 107(1):38-44., 1999.

NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovascular Research**, v. 69, p. 562 – 573, 2006.

NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T. Role of matrix metalloproteinases in inflammatory bowel disease. **Mol Aspects Med**. v. 26, p. 379–390, 2005.

NAWAZ M, SHAH N, ZANETTI BR, MAUGERI M, SILVESTRE RN, FATIMA F, NEDER L, VALADI H. Extracellular Vesicles and Matrix Remodeling Enzymes: The Emerging Roles in Extracellular Matrix Remodeling, Progression of Diseases and Tissue Repair. **Cells**. 13;7(10). pii: E167., 2018.

NOAH, T.K.; DONAHUE, B.; SHROYER, N.F. Intestinal development and differentiation, **Exp Cell Res**. 317. 2702–2710. 2011.

NOAH, T.K.; SHROYER, N.F.. Notch in the intestine: regulation of homeostasis and pathogenesis, **Annu Rev Physiol**. 75. 263–288, 2013.

OH, J.; TAKAHASHI, R.; ADACHI, E.; KONDO, S.; KURATOMI, S.; NOMA, A.; ALEXANDER, D. B.; MOTODA, H.; OKADA, A.; SEIKI, M.; ITOH, T.; ITOHARA, S.; TAKAHASHI, C.; NODA, M. Mutations in two matrix metalloproteinase genes, MMP-2 and MT1-MMP, are synthetic lethal in mice. **Oncogene**, vol 23, pages 5041–5048. 2004.

OLSZEWSKA E, MATULKA M, MROCZKO B, PRYCYNICZ A, KEMONA A, SZMITKOWSKI M, MIERZWINSKI J, PIETREWICZ T. Diagnostic value of matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 1 in cholesteatoma. **Histol Histopathol** 31:307–315, 2016.

OMAR, N.F.; GOMES, J.R.; NEVES, J.S. MT1-MMP expression in the odontogenic region of rat incisors undergoing interrupted eruption. **J Mol Hist**. 42: 505. 2011.

OVERALL CM, TAM E, MCQUIBBAN GA, MORRISON C, WALLON UM, BIGG HF, KING AE, ROBERTS CR. Domain Interactions in the Gelatinase A TIMP-2 MT1-MMP Activation Complex: The ectodomain of the 44-kDa form of membrane type-I Matrix Metalloproteinase does not modulate gelatinase A activation. **J Biol Chem** 275:39497–39506, 2000.

PASTWIŃSKA J, AGIER J, DASTYCH J, BRZEZIŃSKA-BŁASZCZYK E. Mast cells as the strength of the inflammatory process. **Pol J Pathol**. 68(3):187-196., 2017.

PEJLER, G.; RÖNNBERG, E.; WAERN, I.; WERNERSSON, S. Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease. **Blood**. 115:4981-4990, 2010.

PHILLIPS TM, FADIA M, LEA-HENRY TN, SMILES J, WALTERS GD, JIANG SH. MMP2 and MMP9 associate with crescentic glomerulonephritis. **Clin Kidney J.** 10(2):215-220, 2017.

QUICK RE, DUNLAP JA, JESSEN JR. Expression analysis of zebrafish membrane type-2 matrix metalloproteinases during embryonic development. **Gene Expr Patterns.** 12(7-8):254-60, 2012.

SALZMAN, N.H.; GHOSH, D.; HUTTNER, K.M.; PATERSON, Y.; BEVINS, C.L. Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin, **Nature** 422, 522–526, 2003.

SCUDAMORE CL, JEPSON MA, HIRST BH, MILLER HR. The rat mucosal mast cell chymase, RMCP-II, alters epithelial cell monolayer permeability in association with altered distribution of the tight junction proteins ZO-1 and occludin. **Eur J Cell Biol.** 75(4):321-30., 1998.

SHAHBAZI, M.N.; JEDRUSIK, A.; VUORISTO, S.; RECHER, G.; HUPALOWSKA, A.; BOLTON, V.; et al., Self-organization of the human embryo in the absence of maternal tissues, **Nat Cell Biol.** 18, 700–708, 2016.

SHIOMI, T.; LEMAÎTRE, V.; D'ARMIENTO, J. et al. Matrix metalloproteinases, a disintegrin and metalloproteinases, and a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs in non-neoplastic diseases. **Pathology International.** v.60:477–496, 2010.

SHIPLEY JM, DOYLE GAR, FLISZAR CJ, YE QZ, JOHNSON LL, SHAPIRO SD, WELGUS HG, SENIOR RM. The Structural Basis for the Elastolytic Activity of the 92-kDa and 72-kDa gelatinases: Role of the fibronectin type II repeats. **J Biol Chem** 271:4335–4341. 1996.

SHYER, A.; TALLINEN, T.; NERURKAR, N.; WEI, Z.; GIL, E.; KAPLAN, D.; et al. Villification: how the gut gets its villi, **Science** 342, 212–218, 2013.

SMITH, D. M.; GRASTY, R. C.; THEODOSIOU, N. A. et al. Evolutionary relationships between the amphibian, avian, and mammalian stomachs. **Evo Develop.** 2:6, 348–359, 2000.

SOARES, M.A.M., OKADA, M.A., AYUB, L.C., GOMES JR., S., Effects of fasting at different stages of lighting regimen on the proliferation of jejunal epithelial cells during rat pup weaning. **The Anatomical Record.** Rec. 292, 955–959. 2009.

SPENCE, J.R.; LAUF, R.; SHROYER, N.F. Vertebrate intestinal endoderm development, **Dev. Dyn.** 240 501–520. 2011.

STAMENKOVIC, I. Extracellular matrix remodeling: the role of matrix metalloproteinases. **J Pathol** 200:448–464, 2003.

STEFFENSEN B, WALLON UM, OVERALL CM. Extracellular matrix binding properties of recombinant fibronectin type II-like modules of human 72-kDa gelatinase/type IV collagenase. High affinity binding to native type I collagen but not native type IV collagen. **J Biol Chem** 270:11555–11566. 1995.

TALVENSAARI-MATTILA A, PÄÄKKÖ P, TURPEENNIEMI-HUJANEN T. Matrix metalloproteinase- 2 (MMP-2) is associated with survival in breast carcinoma. **Br J Cancer** 89:1270–1275, 2003.

TCHOUGOUNOVA E, LUNDEQUIST A, FAJARDO I, WINBERG JO, ABRINK M, PEJLER G. A key role for mast cell chymase in the activation of pro-matrix metalloproteinase-9 and pro-matrix metalloproteinase-2. **J Biol Chem.** 280(10):9291-6., 2005.

TOJYO, Y. Developmental changeover in rat duodenal alkaline phosphatase. **Comp Biochem Physiol B.** 77(3):437-41. 1984.

TURNER, J.R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease, **Nat Rev Immunol.** 9, 799–809, 2009.

UEZATO T, FUJITA M._Developmental transition of alkaline phosphatase from suckling to adult type in rat small intestine: molecular species and effect of injected cortisone and thyroxine. **J Biochem.** 94(5):1483-8., 1983.

VAILLANT, C.; MEISSIREL, C.; MUTIN, M.; BELIN, M-F.; LUND, L. R.; THOMASSET, N. SAP-9 deficiency affects axonal outgrowth, migration, and apoptosis in the developing cerebellum. *Mol and Cell Neuroscience*. Vol 24, Issue 2, p395-408. 2003.

VAN DER FLIER, L.G.; CLEVERS, H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium, **Annu Rev Physiol.** 71, 241–260, 2009.

VANDOOREN, J.; VAN DEN STEEN, P. E.; OPDENAKKER, G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): The next decade. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, Early Online: 1–51, 2013.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases structure, function, and biochemistry. **Circ Res.** 92, 827–839, 2003.

VU, T.H.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. **Genes Dev.** 14(17), 2123-2133, 2000.

WALTON, K.D.; KOLTERUD, A.; CZERWINSKI, M.J.; BELL, M.J.; PRAKASH, A. ; KUSHWAHA, J.; et al. Hedgehog-responsive mesenchymal clusters direct patterning and emergence of intestinal villi, **Proc Natl Acad Sci.** 109. 15817–15822, 2012.

WALTON, K. D.; FREDDO, A. M.; WANG, S.; GUMUCIO, D. L. Generation of intestinal surface: an absorbing tale. **Development**, 143, 2261-2272, 2016.

WOESSNER JF, JR. The family of matrix metalloproteinases. **Ann NY Acad Sci** 732:11–21. 1994.

XU H, BIN NR, SUGITA S. Diverse exocytic pathways for mast cell mediators. **Biochem Soc Trans.** 46(2):235-247., 2018.

YANG, Y.; LU, N.; ZHOU, J.; CHEN, Z.; ZHU, P. Cyclophilin A up-regulates MMP-9 expression and adhesion of monocytes/macrophages via CD147 signalling pathway in rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, Vol 47, Issue 9, p1299–1310, 2008.

YU G, KOVKAROVA-NAUMOVSKI E, JARA P, PARWANI A, KASS D, RUIZ V, LOPEZ-OTIN C, ROSAS IO, GIBSON KF, CABRERA S, RAMIREZ R, YOUSEM SA, RICHARDS TJ, CHENSNY LJ, SELMAN M, KAMINSKI N, PARDO A. Matrix metalloproteinase-19 is a key regulator of lung fibrosis in mice and humans. **Am J Respir Crit Care Med** 186:752–762., 2012.

YU G, HERAZO-MAYA JD, NUKUI T, ROMKES M, PARWANI A, JUAN-GUARDELA BM, ROBERSON J, GAULDIE J, SIEGFRIED JM, KAMINSKI N, KASS DJ. Matrix metalloproteinase-19 promotes metastatic behavior in vitro and is associated with increased mortality in non- small cell lung cancer. **Am J Respir Crit Care Med** 190:780–790., 2014.

ZAMBUZZI, W.F., YANO, C.L., CAVAGIS, A.D.M. Ascorbate-induced osteoblast differentiation recruits distinct MMP-inhibitors: RECK and TIMP-2. **Mol Cell Biochem.** 322: 143. 2009.

ZITKA, O., KUKACKA, J., KRIZKOVA, S., HUSKA, D., ADAM, V., MASARIK, M., PRUSA, R., KIZEK, R. Matrix metalloproteinases. **Curr Med Chem.** 17, 3751–3768, 2010.

ZORN, A.M.; WELLS, J.M. Vertebrate endoderm development and organformation, *Annu. Rev Cell Dev Biol.* 25, 221–251, 2009.